

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/027145 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12N  
15/12, 1/21, 1/15, 1/19, 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50,  
33/53, 33/577, C12Q 1/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09959

(22) 国際出願日: 2002 年 9 月 26 日 (26.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-294794 2001 年 9 月 26 日 (26.09.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学  
研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市広  
沢 2 番 1 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 良輔 (TAKA-  
HASHI, Ryosuke) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市  
広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 鈴木 泰  
行 (SUZUKI, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和  
光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 今居  
譲 (IMAI, Yuzuru) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市  
広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 瀧尾 擴  
士 (TAKIO, Koji) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市  
広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 中山 洋  
(NAKAYANA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和  
光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都港区 虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5  
森ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

/続葉有/

(54) Title: CELL DEATH INDUCER, CELLS AND ANIMALS EXPRESSING THE SAME AND METHOD OF SCREENING  
ANTI-CELL DEATH REMEDY

(54) 発明の名称: 細胞死誘導因子、発現細胞および動物ならびに抗細胞死治療薬のスクリーニング方法

(57) Abstract: A novel protein participating in cell death and a gene encoding the protein; use of the above protein or the gene in screening an anti-cell death factor to be used in treating diseases caused by excessive cell death or a remedy for diseases caused by abnormal inhibition of cell death; and the above screening methods. Human HtrA2 and human HtrA2-expressing cells and animals for screening an anti-cell death factor to be used in treating diseases caused by excessive cell death; a method of screening an anti-cell death factor to be used in treating diseases caused by excessive cell death; and a method of screening a remedy for diseases caused by abnormal inhibition of cell death.

(57) 要約:

細胞死に関与する新たなタンパク質および該タンパク質をコードする  
遺伝子の提供、該タンパク質または該遺伝子の細胞死の過剰によって起  
こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子または細胞死の異常な抑制によっ  
て起こる疾患の治療薬のスクリーニングへの使用の提供および該スクリ  
ーニング方法の提供。細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる  
抗細胞死因子のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 およびヒト HtrA2  
発現細胞、発現動物、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる  
抗細胞死因子のスクリーニング方法、および細胞死の異常な抑制によっ  
て起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

BEST AVAILABLE COPY



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

細胞死誘導因子、発現細胞および動物ならびに抗細胞死治療薬のスクリーニング方法

### 技術分野

本発明は、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングおよびヒト HtrA2 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングに関する。

### 背景技術

アポトーシスは生理的な細胞の自殺のプログラムであり、あらゆる動物の発生過程や恒常性の維持に決定的な役割を果たしている (Jacobson et al., 1997)。アポトーシスの異常な抑制は癌や自己免疫疾患の特徴であり、過剰なアポトーシスは神経変性疾患への関与が想像されている (Thompson, 1995)。カスパーゼは細胞内のシステインプロテアーゼのファミリーであり、アポトーシスの中心的な実行分子である (Thornberry and Lazebnik, 1998)。エフェクターカスパーゼ、たとえばカスパーゼ-3、-7 はカスパーゼ-9 のようなイニシエーターカスパーゼによって、切断されることによって活性化される。いったん活性化されると、エフェクターカスパーゼはさまざまな構造タンパク質、調節タンパク質を酵素的に分解する結果、アポトーシスの表現型をもたらす。

アポトーシス阻害タンパク質 (IAPs) はもともと昆虫ウイルスのパキウロウイルスでみつかったが、じつは進化的に昆虫からヒトまで大変よく保存され、アポトーシスの調節に重要な役割を担っているタンパク質である (Deveraux and Reed, 1999; Miller, 1999)。いくつかのヒト IAP ファミリータンパク質、たとえば XIAP、c-IAP1、c-IAP2 はカスパーゼ-3、-7、-9 に直接結合してその活性を阻害する強力な阻害因子であることがわかっている (Deveraux, et al., 1997, 1998; Roy et al., 1997)。

上記の IAP のうち、XIAP がカスパーゼとそれによって引き起こされるアポトーシスの阻害因子としてはもっとも強力なものである (Deveraux and Reed, 1999)。XIAP の構造は N 末端領域におけるバキュロウイルス IAP リピート (BIR) ドメインの 3 回くり返し構造と C 末端領域における RING フィンガードメインによって特徴づけられる。構造機能解析によって XIAP の二番目の BIR ドメイン (BIR2) がカスパーゼ-3、-7 を阻害するのに十分であるのに対し、三番目の BIR ドメイン (BIR3) をカバーする領域はカスパーゼ-9 を特異的に阻害する (Deveraux, et al., 1999; Sun et al., 2000)。まとめるとこれらのデータは IAP の BIR ドメインがカスパーゼ活性を阻害するのに肝要であることを示唆している。

最近、Smac/DIABLO と呼ばれる新規タンパク質が同定された。このタンパク質は IAP のカスパーゼ阻害活性をなくすことによってカスパーゼ活性化を促進する働きがあることがわかった (Du et al., 2000; Verhaegen et al., 2000)。Smac は 239 アミノ酸の前駆体タンパク質として合成される。N 末 55 アミノ酸はミトコンドリア輸送シグナルとして働き、ミトコンドリアにタンパク質が運ばれたのちには切り落とされる。さまざまなアポトーシス刺激に応じて成熟型 Smac は細胞質に放出され、そこで細胞質タンパクである IAP に結合し、その活性を阻害する。その後の研究によって Smac は AVPI という配列ではじまる、N 末端で XIAP の BIR2 と BIR3 に結合することが判明した。さらに Smac の N 末端のアミノ酸を変異させると XIAP を阻害する活性は失われた。いくつかのショウジョウバエの細胞死タンパク質、Reaper、Hid、Grim の N 末端は Smac に似ており、その N 末端で IAP の活性を阻害することがわかっている (Abrams, 1999; Srinivasula et al., 2001)。Smac はこのようなハエのタンパク質の機能的なホモログを考えられているが、Smac が IAP に結合し、その活性を阻害する唯一の哺乳類タンパク質であるかどうかは不明であった (Du et al., 2000; Holcik and Korneluk, 2001)。

ミトコンドリアは生理的な細胞死においてきわめて重要な働きをしている (Green and Reed, (1998) Science 281, 1309-12)。さまざまなアポトーシス刺激はミトコンドリア外膜の透過性を高め、膜間スペースに存

在するさまざまな細胞死誘導タンパク質の放出を引き起こす。このような細胞死タンパク質には、チトクロム c、カスパーゼ-2、-3、-7、-9 そしてアポトーシス誘導因子 (AIF) などが含まれる (Kroemer and Reed, (2000) Nat. Med. 6, 513-9)。Smac/DIABLO は最近同定されたミトコンドリア由来の細胞死誘導タンパク質で、ミトコンドリアから細胞質に放出され、XIAP に直接結合し、そのカスパーゼ阻害活性を阻害してしまう (Du et al., (2000) Cell 102, 33-42; Verhagen et al., (2000) Cell 102, 43-53)。

このように、従来アポトーシス実行因子としてカスパーゼが重要視されており、カスパーゼを阻害すればアポトーシスの抑制が可能になるであろうという予測から、アポトーシスに関連した疾患治療薬の開発も、カスパーゼの阻害をターゲットとしていた。しかし、アポトーシスの刺激によってはカスパーゼを阻害しても細胞死を抑えられない場合があることが知られており、また、アポトーシスの過剰によって起こると考えられている神経変性疾患でも、カスパーゼを用いない細胞死が起こっていることが多いこともわかってきている。このようなカスパーゼを用いない能動的な細胞死に関わる新たなタンパク質が存在する可能性があった。

従来からセリンプロテアーゼファミリーのひとつとして HtrA セリンプロテアーゼファミリーが知られていた (Faccio et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2581-8; Gray et al., (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5699-710; Hu et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 34406-12; Savopoulos et al., (2000) Protein Expr. Purif. 19, 227-34)。このうち、バクテリアの HtrA 遺伝子産物は HtrA セリンプロテアーゼファミリーの中でももっともよく特徴が明らかにされている ; Htr は “High temperature requirement” (“高熱で必要”) を意味する。Htr エンドペプチダーゼはバクテリアのペリプラスムに局在し、その存在はバクテリアの熱耐性にどうしても必要である (Lipinska et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16, 10053-67, (1990) J. Bacteriol. 172, 1791-7; Seol et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 730-6)。そのうえ、最

近、バクテリアの HtrA は二重の働きを持っており、正常な温度ではシャペロンとして、高温ではタンパク質分解酵素として働くことが判った (Speiss et al., (1999) Cell 97, 339-47)。

#### 発明の開示

本発明は、従来知られていなかった細胞死に関与する新たなタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を提供し、さらに該タンパク質または該遺伝子の細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子または細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングへの使用および該スクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、鋭意検討の結果、IAP の活性を阻害する Smac 以外のタンパク質を見出した。すなわち、XIAP に結合する分子量 36,000 のタンパク質を見出し、アミノ酸配列および質量分析により、このタンパク質の物理化学的性質を明らかにし、さらにこのタンパク質の細胞死誘導作用について解析を行った結果、セリンプロテアーゼである新しい細胞死誘導因子 HtrA2 (または、Omi) を単離、同定した。本発明者らは新たな XIAP 結合タンパク質として HtrA2 を分離同定し、HtrA2 が XIAP を Smac と似たやり方で阻害することを証明した。

本発明者らの解析手法は、培養細胞に過剰発現した XIAP の免疫沈降物をエドマン分解を用いたアミノ酸配列分析と、エレクトロスプレーイオン化法を使ったタンデム質量分析法によって解析するというものであった (Faccio et al., 2000; Gray et al., 2000)。

HtrA2 はバクテリアからヒトに至るまで、大変よく保存されているセリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質で、ヒトの HtrA2 セリンプロテアーゼはとくにタンパク質の C 末端領域でバクテリアの HtrA およびもう一つの既知のヒト HtrA である L56 と広汎なホモロジーを呈する (Hu et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 34406-12)。HtrA2 タンパクは膜貫通領域と推定される領域、トリプシン様のカタリティックドメイン、そして PDZ ドメインをそれぞれアミノ酸 105-121、182-330、390-

445 の領域にそれぞれ持っている (Faccio et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2581-8)。HtrA2 は小胞体か、または核に局在すると報告されていたが (Faccio et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2581-8; Gray et al., (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5699-710)、本発明者らは HtrA2 がミトコンドリアのタンパク質であることを見出した。

成熟型 HtrA2 はアポトーシス刺激に反応してミトコンドリアから放出されるので、正常の状態ではチトクロム c や Smac 同様、膜間スペースに存在している。成熟型 HtrA2 の N 末端の 4 アミノ酸、AVPS が Smac の N 末端の 4 アミノ酸、AVPI に非常によく似ていることはこの 2 つのタンパク質が非常に似たやり方で IAP を阻害するよい証拠となっている (Chai et al., (2000) Nature 406, 855-62)。ノーザンブロットでは Smac のメッセンジャー RNA は脳、胎盤、肺、白血球などでは発現量が非常に低いのに対し、HtrA2 は比較的どこにでも発現しているように見える (Gray et al., (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5699-710)。このような事実は、これらの 2 種類のタンパク質はさまざまな組織で相互補完的に働いていることを示唆する。

HtrA2 の前駆体は 50 キロダルトン (kDa) タンパク質であり、ミトコンドリアに輸送されたあと、N 末端のアミノ酸が切り落とされて、36kDa の成熟型タンパク質ができるが、その N 末端が Smac の N 末端に類似している。HtrA2 の前駆体は IAP に結合しないが、成熟型 HtrA2 は Smac と良く似たやり方で IAP に結合する。成熟型 HtrA2 は通常ミトコンドリアに隔離されているが、アポトーシスの刺激 (細胞死刺激) を加えると、細胞質に放出される。細胞質に放出された HtrA2 は、XIAP に結合して XIAP のカスパーゼ阻害活性を阻害してアポトーシスを起こしやすくする。さらに、培養細胞中でミトコンドリアの外側に HtrA2 を過剰発現させると、細胞は丸く縮んで死ぬが、カスパーゼ活性の上昇は認められず、カスパーゼ阻害剤によっても抑制されない。しかし、セリンプロテアーゼ活性を阻害するとこの作用は消失する。このように、過剰発現したカスパーゼ非依存的、セリンプロテアーゼ依存的にいっぽう変わった細胞死を引き起こす。このように、本発明者らは、HtrA2 は二つの異なったメ

カニズム、IAP への直接の結合を介する IAP の阻害作用で、カスパーゼ活性の有意の増加を伴うメカニズムおよび IAP 阻害非依存的、カスパーゼ非依存的、しかしセリンプロテアーゼ依存的なメカニズム、で細胞死を促進、または誘導することを見出した。最近、非アポトーシスでカスパーゼ非依存的な細胞死が癌や神経変性疾患でみられる細胞死に関与する可能性が指摘されていることから、非常に注目を集めている (Kitanaka and Kuchino, (1999) Cell Death Differ. 6, 508-15; Sperandio et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14376-81)。

これらのデータは HtrA2 がセリンプロテアーゼ依存的な細胞死誘導作用を持った Smac に類似した IAP の阻害因子であるとともに、HtrA2 がカスパーゼを用いる経路とカスパーゼを用いない経路の 2 通りの様式で細胞死を引き起こす新しいタイプの細胞死誘導因子であることを示している。

本発明者らは、さらにこの新しい細胞死誘導因子である HtrA2 を用いた細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニング、すなわち抗細胞死治療剤およびそのスクリーニング方法および細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法を見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) 細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 タンパク質。

(2) 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される (1) のヒト HtrA2 タンパク質。

(3) ヒト HtrA2 タンパク質が配列番号 2 に示される配列の第 134 番目から第 458 番目のアミノ酸配列を含む、(1) または (2) のヒト HtrA2 タンパク質。

(4) 細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。



(5) 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される(4)のヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。

(6) ヒト HtrA2 タンパク質が配列番号 2 に示される配列の第 134 番目から第 548 番目のアミノ酸配列を含む、(4) または (5) のヒト HtrA2 を発現する細胞。

(7) (1) ~ (3) のいずれかのヒト HtrA2 タンパク質を用いた、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニング方法。

(8) (4) ~ (6) のいずれかのヒト HtrA2 タンパク質を発現する細胞を用いた、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニング方法。

(9) 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される、請求項 7 または 8 記載の抗細胞死因子のスクリーニング方法。

(10) ヒト HtrA2 タンパク質のセリンプロテアーゼ活性を阻害する因子のスクリーニングである、(7) ~ (9) のいずれかのスクリーニング方法。

(11) 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。

(12) 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、(11) のヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。

(13) 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え動物。

(14) 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、(13) のヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え動物。

(15) (11) または (12) の細胞に被験物質を投与し、ミトコンドリアから細胞質への HtrA2 タンパク質の放出を測定することを含む、細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(16) (13) または (14) の動物に被験物質を投与し、ミトコンドリアから細胞質への HtrA2 タンパク質の放出を測定することを含む、細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(17) 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、(15) または (16) の細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(18) ミトコンドリアから細胞質へ放出される HtrA2 を抗 HtrA2 抗体を用いて測定する、(15) ~ (17) のいずれかの細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. HtrA2 遺伝子 DNA の取得

本発明において、DNA の取得は、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989): Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 及び Ed Harlow and David Lanc (1988): Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 等の当業者に良く知られた文献に記載された方法に従って取得することができる。

XIAP と結合するタンパク質を単離、精製し約 36kDa の成熟型タンパク質を回収することにより HtrA2 タンパク質を得ることができる。このタンパク質を公知のタンパク質アミノ酸配列決定法で、配列決定し、得られたアミノ酸配列から適当なプライマーを設計する。次いで、ヒト細胞または組織から抽出した RNA から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、HtrA2 遺伝子を取得することができる。また、RT-PCR により HtrA2 を直接増幅して得ることもできる。

HtrA2 遺伝子 DNA として、配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA、または配列番号 2 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA が挙げられる。

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する 458 アミノ酸の HtrA2 は前駆体 HtrA2 であり、N 末の 133 アミノ酸はミトコンドリア輸送シグナルとして働き、ミトコンドリアにタンパク質が運ばれた後に切り落とされて、325 アミノ酸の成熟型タンパク質となる。本発明で用いる HtrA2 タンパク質には前駆体 HtrA2 タンパク質も配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列を有する成熟型タンパク質も含まれる。

HtrA2 遺伝子 DNA の変異体は、野生型の HtrA2 の cDNA に、公知の方法で変異誘導することによって作製することができる。HtrA2 遺伝子 DNA の変異体として、配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ HtrA2 タンパク質の活性を有するタンパク質をコードする DNA、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 2 の第 1 番目のアミノ酸から第 133 番目のアミノ酸が切り落とされた後において HtrA2 タンパク質の活性を有するタンパク質または配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ HtrA2 タンパク質の活性を有するタンパク質が挙げられる。ここで、ストリンジントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高い DNA 同士、すなわち 60% 以上、好ましくは 80% 以上の相同性を有する DNA 同士がハイブリダイズし、それにより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が 150~900mM、好ましくは 600~900mM であり、温度が 60~68℃、好ましくは 65℃での条件をいう。

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列としては、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列の 1~10 個、好ましくは 1~5 個、さ

さらに好ましくは 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が欠失したもの、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列の 1~10 個、好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したもの、または、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列に 1~10 個、好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が付加したものが挙げられる。

このような配列番号 2 のアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列として、それぞれ配列番号 2 もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列のアミノ酸配列と、BLAST（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて）を用いて計算したときに、少なくとも 60% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の相同性を有しているものが挙げられる。

一旦遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされた cDNA を鋳型とした PCR によって、あるいは該塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、HtrA2 遺伝子 DNA またはその変異体を得ることができる。このようにして、得られた DNA により配列番号 2 のアミノ酸配列もしくは配列番号 2 の第 134 番目のアミノ酸から第 458 番目のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ HtrA2 タンパク質の活性を有するタンパク質を取得することができる。

ここで、「HtrA2 タンパク質の活性」とは、セリンプロテアーゼ活性をいい、該活性を有することは、例えば  $\beta$  カゼインを基質としたインビトロでのプロテアーゼアッセイにより決定することができる。

## 2. HtrA2 タンパク質および組換え HtrA2 タンパク質発現細胞の取得

本発明の HtrA2 遺伝子 DNA およびその変異体を発現ベクターに挿入し、

適当な宿主細胞に該ベクターを導入することにより、HtrA2 タンパク質発現細胞を得ることができる。この際用いる DNA は、配列番号 1 に示される HtrA2 の全長遺伝子でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする DNA でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 1 番目～第 133 番目のアミノ酸をコードする部分を除いた DNA でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 134 番目～458 番目のアミノ酸配列をコードする DNA でもよい。前 2 者の DNA からは前駆体 HtrA2 が発現され、後 2 者の DNA からは成熟型 HtrA2 が発現される。また、適宜 GST をコードする DNA やヘキサヒスチジンをコードする DNA を連結させてもよい。ベクターとして、プラスミド、ファージ、ウイルス等の宿主細胞において複製可能である限りいかなるベクターも用いることができる。例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pKC30、pCFM536 等の大腸菌プラスミド、pUB110 等の枯草菌プラスミド、pG-1、YEp13、YCp50 等の酵母プラスミド、 $\lambda$ gt110、 $\lambda$ ZAPII 等のファージの DNA 等が挙げられ、哺乳類細胞用のベクターとしては、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルス DNA、SV40 とその誘導體等が挙げられる。ベクターは、複製開始点、選択マーカー、プロモータを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列（ターミネーター）、リボソーム結合部位、ポリアダニル化シグナル等を含んでいてもよい。プロモータとしては、宿主細胞で効率よく発現するものであればいかなるプロモータでもよいが、例えば、SR $\alpha$  プロモータ、SV40 プロモータ、LTR プロモータ、CMV プロモータ、HSV-TK プロモータ等が挙げられる。

宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌等の細菌細胞、アスペルギルス属菌株等の真菌細胞、パン酵母、メタノール資化性酵母等の酵母細胞、ドロソフィラ S2、スポドプテラ Sf9 等の昆虫細胞、HEK293T、Hela 細胞、SH-SY5Y、CHO、COS、BHK、3T3、C127 等の哺乳類細胞等が挙げられる。

形質転換は、塩化カルシウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、エレクトロポレーション等の公知の方法で行うことができる。

このようにして得られた HtrA2 タンパク質発現細胞から HtrA2 タンパク質を単離することができる。単離されたタンパク質のうち、例えば成熟型 HtrA2 タンパク質および成熟型タンパク質を発現する細胞、特に動物細胞を細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングのために用いることができ、前駆体タンパク質を発現する細胞を細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングのために用いることができる。

### 3. 抗 HtrA2 タンパク質抗体の取得

HtrA2 タンパク質を抗原として、当業者に良く知られた方法に従い例えばマウス、モルモット、ウサギ、ヤギ等の動物の皮下、筋肉内、腹腔内、静脈に複数回接種し、十分に免疫した後、動物から採血し、血清分離し、抗 HtrA2 タンパク質抗体を作製することができる。この際、適当なアジュバントを使用することもできる。モノクローナル抗体も公知の方法により作製し得る。例えば、HtrA2 タンパク質で免疫したマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞との細胞融合により得られるハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマの培養上清又は該ハイブリドーマを腹腔内に投与したマウスの腹水から調製することができる。免疫抗原として用いる HtrA2 タンパク質は、天然蛋白質、組換え蛋白質でもよいし、化学合成したものでもよい。また、全アミノ酸配列を有する蛋白質でもよいし、該蛋白質の部分構造を有するペプチドフラグメントや他の蛋白質との融合蛋白質でもよい。ペプチドフラグメントは該蛋白質を適当な蛋白質分解酵素で分解した断片も用い得るし、配列番号 1 に示す塩基配列の全部または一部を発現ベクターに組み込んで発現させた産物でもよい。なお、ミトコンドリアから細胞質へ放出される成熟型 HtrA2 タンパク質を測定する場合には、成熟型 HtrA2 タンパク質またはその断片を免疫抗原として用いるのが望ましい。ポリペプチドフラグメントを適当なキャリア蛋白質と化学結合により結合させた上で使用することもできる。得られた抗体の反応性は、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ウエスタンブロッティング等の当業者によく知られた方法により測定することができる。

#### 4. HtrA2 発現モデル動物の取得

HtrA2 発現モデル動物へ導入する遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。これらの配列については特に制限はなく、通常用いられている配列を適宜に組み合わせることができる。この際導入する DNA は、配列番号 1 に示される HtrA2 の全長遺伝子でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする DNA でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 1 番目～第 133 番目のアミノ酸をコードする部分を除いた DNA でもよいし、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 134 番目～458 番目のアミノ酸配列をコードする DNA でもよい。ミトコンドリアから細胞質へ放出される成熟型 HtrA2 タンパク質を測定する場合には、前 2 者が望ましい。

トランスジェニック動物の作成は、例えば、Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980 の方法等に従って、上記導入遺伝子を哺乳動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって作成することができる。哺乳動物としては、近交系が多数作出されており、しかも受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが好ましいが、技術的には全ての動物種を対象とすることが可能である。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有する ES 細胞のような培養細胞が挙げられる。培養細胞への遺伝子導入法としては、公知の静電パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等も利用できるが、トランスジェニック動物個体の産出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を勘案した場合、受精卵への DNA 溶液の物理的注入（マイクロインジェクション）法が好ましい。

遺伝子を注入した全能性細胞を、仮親の卵管に移植し、個体まで発生させることにより、HtrA2 発現動物を得ることができる。DNA を体細胞から抽出し、サザンブロット分析や PCR アッセイ等を用いて導入遺伝子の存在を確認することができる。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代 (Founder) として、交配により HtrA2 遺伝子またはその変異体を染色体の一部に安定的に組み込んだ動物を効率よく作出することができる。

## 5. 抗細胞死治療剤のスクリーニング

上述の成熟型 HtrA2 タンパク質、成熟型 HtrA2 タンパク質を発現する細胞を細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングに用いることができる。細胞死の過剰によって起こる疾患としては、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズ等が挙げられる。

成熟型 HtrA2 タンパク質を生体の様々な組織の抽出液と混合し、HtrA2 タンパク質のセリンプロテアーゼ活性を阻害するタンパク質をスクリーニングすることにより細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子を選択することができる。また、HtrA2 タンパク質と結合するタンパク質を選択し、該タンパク質の機能を解析することによっても、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子を単離することができる。あるいは成熟型 HtrA2 タンパク質を発現、好ましくは過剰に発現する細胞を用いてもよい。

## 6. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング

HtrA2 タンパク質を発現する細胞または形質転換動物を用いて細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。細胞死の異常な抑制によって起こる疾患としては、自己免疫疾患および癌等が挙げられる。この際、用いる細胞には前駆体 HtrA2 をコードする遺伝子を組み込んでおくのが望ましく、HtrA2 タンパク質はミトコンドリアに局在するように発現させる。次いで、被験物質を細胞または動物に投与し、ミトコンドリアからの HtrA2 タンパク質を放出させる活性を指標にして、細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。HtrA2 タンパク質をミトコンドリアから放出させる活性は、例えばミトコンドリアから放出された細胞質中の HtrA2 を抗 HtrA2 抗体を用いて測定することによって行うことができる。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、HtrA2 の SDS-PAGE の結果を示す図である。



図 2 は、HtrA2 の逆相クロマトグラムを示す図である。

図 3 は、ヒト HtrA2 の全長アミノ酸配列を示す図である。

図 4 は、内在性 XIAP と内在性 HtrA2 の結合を示す図である。

図 5 は、成熟型 HtrA2 と IAP ファミリータンパク質の結合を示す図である。

図 6 は、HtrA2 全長と成熟型の模式図である。

図 7 は、recHtrA2 (AVPS) および recHtrA2 (MVPS) の XIAP の BIR2 および BIR3 ドメインに対する結合を示す図である。

図 8 は、カスパーゼ 3 のプロセッシングと XIAP の BIR2 (XIAP-BIR2) および BIR3+RING ドメイン (XIAP-BIR3+RING) の作用点を示す図である。

図 9 は、recHtrA2 (AVPS) および recHtrA2 (MVPS) は XIAP の BIR2 (GST-BIR2) のカスパーゼ 3 活性阻害作用および BIR3 (GST-BIR3) のカスパーゼ 9 活性阻害作用の作用に対する効果を示す図である。

図 10 は、XAIP の HtrA2 のセリンプロテアーゼ活性の阻害効果の有無を示す図である。

図 11 は、HeLa 細胞の細胞分画を示す図である。

図 12 は、HtrA2 とチトクロム c (Cyt c) の UV 照射後の細胞質画分への移行を示す写真である。

図 13 は、HtrA2 とチトクロム c (Cyt c) の免疫染色の結果を示す図である。

図 14 は、家族性 ALS モデルマウスの脊髄において、加齢（生後 1 ヶ月、3 ヶ月、5 ヶ月）に伴って HtrA2 が細胞質に放出されてくることを示す HtrA2 のウエスタンブロット分析の結果を示す図である。

図 15 は、HtrA2 による UV 照射によるカスパーゼ活性 (DEVDase 活性) の増強を示す図である。

図 16 は、成熟型 HtrA2 の非典型的な細胞死の誘導を示す写真である。

図 17 は、成熟型 HtrA2 のプロテアーゼ活性が非典型的な細胞死誘導に必要であることを示す図である。

図 18 は、成熟型 HtrA2 による有意なカスパーゼ活性 (DEVDase 活性) の上昇の有無を示す図である。

図19は、カスパーゼインヒビターによる HtrA2 の作用の阻害効果の有無を示す図である。

#### 配列表テキスト

配列番号3および4：合成

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

本発明の実施例において、トランスフェクション、共免疫沈降およびイムノブロット解析は以下の方法で行った。

〔トランスフェクション、共免疫沈降、イムノブロット解析〕

HEK293 および HeLa 細胞は LipofectAMINE 試薬 (GIBCO-BRL 社製) によりトランスフェクションされた。共免疫沈降の際は、10 cm ディッシュに  $2 \times 10^6$  個の HEK293 細胞をプレーティングし、翌日、5  $\mu$ g の FLAG タグや Myc タグの付いた IAP と 5  $\mu$ g の HA タグの付いた HtrA2 の発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後に 5  $\mu$ M のプロテアソーム阻害剤 (MG132、Peptide Institute) を含む培地に代え、さらに16時間培養した後、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液中の IAP を抗 FLAG M2 抗体 (Sigma 社製) あるいは抗 Myc 9E10 抗体 (Santa Cruz biotechnology 社製) により免疫沈降し、SDS-PAGE および PVDF 膜 (Immobilon、Millipore 社製) への転写後、共免疫沈降物を抗 HA 3F10 抗体 (Roche Diagnostics 社製) によりイムノブロット解析した。一次抗体の検出には ECL キット (Amersham Pharmacia 社製) を用いた。

また、以下の方法で組み換えタンパク質を調製した。

〔組み換えタンパク質〕

GST タグの付いた XIAP タンパク質は Suzuki et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 27058-63 記載の方法で調製した。C 末ヘキサヒスチジンタグの付いた HtrA2 およびその変異型は pET28a プラスミドにサブクローニ

ングし、組み換えタンパク質を Savopoulos et al., 2000 Protein Expr. Purif. 19, 227-34 に記載の方法により調製した。タンパク質濃度は、Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit または Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce 社製) により測定した。

細胞分画および免疫染色は以下のようにして行った。

#### 〔細胞分画〕

HeLa 細胞を 3 倍量のバッファー A (20 mM Hepes-KOH [pH 7.5], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 250 mM sucrose) に懸濁し、29 ゲージの注射針を 10 回通した後、750×g で 10 分間の遠心分離を 2 回行い、上清を回収した。10,000×g で 15 分間の遠心分離を行い、沈降物を重膜画分とした。上清をさらに 100,000×g で 1 時間遠心分離し、沈降物を軽膜画分、上清を細胞質画分とした。

#### 〔免疫染色〕

HeLa 細胞を 8 穴チャンバースライドに植え継ぎ、24 から 48 時間後に、細胞を PBS で洗い、4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2%Triton X-100 で透水性にし、抗ヒト HtrA2 抗血清 (1:200 希釈) およびチトクロム c 抗体 (PharMingen 社製、1:500 希釈) を加え室温で 1 時間インキュベーションした。1 次抗体は、Alexa 488 か 546 が付いた 2 次抗体 (Molecular Probes 社製) により検出し、共焦点レーザー顕微鏡解析システム (Fluoview, Olympus 社製) により解析した。

さらに、以下の方法でカスパーゼ活性の測定および細胞死アッセイを行った。

#### 〔カスパーゼ活性測定と細胞死アッセイ〕

6 穴ディッシュに  $2 \times 10^6$  個の HeLa あるいは HEK293 細胞をプレーティングし、翌日、1 から 3  $\mu$ g のプラスミド DNA を 0.2  $\mu$ g の pEGFP N3 (Clontech 社製) と共にトランスフェクションした。HeLa 細胞は 24 時間後に紫外線照射し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液中のカスパーゼ活性の測定は Suzuki et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8662-7 に記載の方法で行った。細胞死アッセイは、トランスフェクション

した HEK293 細胞を 24 から 36 時間培養し、GFP 陽性細胞の中で細胞形態が丸くなっていたり、凝縮しているものの割合を測定することにより行った。

#### 〔実施例 1〕 HtrA2 の同定およびクローニング

##### (1) XIAP 結合タンパク質の精製

pcDNA3-FLAG-XIAP $\Delta$ RING をトランスフェクションした 293T 細胞を溶解バッファー (10 mM Tris [pH 8.0], 120 mM NaCl, 5 mM EDTA) に懸濁し、可溶性画分を抽出した。この画分から FLAG-XIAP $\Delta$ RING タンパク質を抗 FLAG M2 抗体を用いて免疫沈降し、溶解バッファーで 5 回洗った後、0.1 M glycine-HCl (pH 2.8) にて FLAG-XIAP $\Delta$ RING タンパク質およびその結合タンパク質を溶出した。溶出物を SDS-PAGE にて分離後、CBB 染色により検出されたバンドを切り出し精製した。

##### (2) HPLC-MS/MS とアミノ酸配列決定

ゲル内消化は Kawasaki et al., (1999) Anal. Biochem. 191, 332-6 に示す方法で行った。すなわち、CBB 染色により検出された 36 kDa のバンドを 0.1  $\mu$ g の Achromobacter Protease I (Lys-C) および 0.1% SDS を含む 50 mM Tris-HCl (pH 9) 中で 37℃ で 12 時間処理し、ゲルから抽出した分解産物のアミノ酸配列を HPLC-MS/MS とエドマン分解により決定した。

##### (3) プラスミドの調製

FLAG タグ付き野生型 XIAP および RING フィンガー欠失型 XIAP をコードするプラスミド (pcDNA3-FLAG-XIAP、pcDNA3-FLAG-XIAP $\Delta$ RING) は Suzuki et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8662-7 に記載の方法で調製した。pcDNA3-FLAG-c-IAP1 と pcDNA3-FLAG-c-IAP2 は、pcDNA3-Myc-c-IAP1 と c-IAP2 の RT-PCR 産物の EcoRI-XhoI 断片のそれぞれを pcDNA3-FLAG-N の EcoRI-XhoI サイトに組み込んだ。pcDNA3-Myc-survivin を含む Myc タグ付き IAP をコードするプラスミド、pcDNA3-Bax、および pCMV-Fas プラスミドは John C. Reed 博士 (Burnham Institute) より供与された。ヒト HtrA2 をコードする DNA は以下のプライマーを用いて RT-PCR により増幅した。前方プライマー、ccgcaattggccATGGCTGCGCC

GAGGGCG (配列番号 3); 後方プライマー、ctctcgagTTCTGTGACCTCAGGGT C (配列番号 4)。PCR 産物の MfeI-XhoI 断片を pcDNA3-Myc-C あるいは pcDNA3-HA-C プラスミドの MfeI-XhoI サイトに挿入し、それぞれ pcDNA3-HtrA2-Myc および pcDNA3-HtrA2-HA を作製した。本明細書の実施例に使用した N 末欠失型 HtrA2 をコードするプラスミドは同様の方法で作製した。また、点変異体は、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作製した。Myc タグ付きヒト Smac/DIABLO をコードするプラスミドは、RT-PCR 産物を pcDNA3-Myc-C の BamHI-XhoI サイトに挿入し作製した。すべてのプラスミドが的確に作製されていることを DNA 配列を決定し確認した。

#### (4) HtrA2 の同定および HtrA2 の取得

新規の XIAP 結合タンパク質を同定するため、N 末端に FLAG タグを付け、RING フィンガーモチーフを欠損させた変異体 (XIAP $\Delta$ RING) を一過性にトランスフェクション (遺伝子導入) した 293T 細胞から細胞抽出液を調製した。これに引き続き、細胞抽出液は抗 FLAG モノクローナル抗体を結合させたアガロースビーズと混合した; XIAP $\Delta$ RING を使ったのは、全長 XIAP よりもその方が発現がよかったからである。徹底的に洗浄したのち、結合タンパク質を酸性条件下で溶出し、SDS-PAGE ゲルで分離した。23 kDa と 36 kDa の二種類のタンパク質のバンドがクマシー染色したゲルで認められた (図 1)。図 1 中、やじりは FLAG-XIAP $\Delta$ RING を示し、A と B のバンドは FLAG-XIAP $\Delta$ RING と共に溶出されたタンパク質を示す。これらのバンドはコントロール FLAG タグつきタンパク質では認められなかった。

23 kDa のバンドは Smac と考えられたので、36 kDa のバンドを新規タンパク質の可能性ありとして重視し、Achromobacter Protease I (別称: Lys-C) で in gel digestion を行った。切断されてできたペプチドはゲルから回収し、引き続き RP-HPLC で分離し、エレクトロイオンスプレー式タンデム質量分析法で配列を解析した。未解釈の MS/MS スペクトラムをデータベース探索で探し出すことができなかったため、エドマン分解法でアミノ酸配列解析を行った。図 2 のフラクション 1 のアミノ酸配

列はヒト HtrA2 の成熟型の N 末端の断片に完全に一致した (Faccio et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2581-8; Gray et al., (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5699-710)。さらにその情報をもとに再度タンデム質量分析法で解析したところ、Lys-C で切断されてできた 7 つの断片は HtrA2 の 13B 型と呼ばれるオルタナティブスプライシング産物でできたタイプの成熟型の全配列をもれなくカバーしていた (図 2、図 3) (Gray et al., 2000 Eur. J. Biochem. 267, 5699-710)。図 2 は、図 1 の A のタンパク質を *Achromobacter* Protease I (Lys-C) により分解し、逆相 HPLC を行った際の溶出結果を示し、ピーク 1 のエドマン分解により得られたアミノ酸配列が成熟型ヒト HtrA2 のアミノ末端断片を含んでいた (図 3、下線)。図 2 のピーク 2、3、4、5 がそれぞれヒト HtrA2 全長の 325-347、238-324、349-395、157-237 に一致した。図 3 は、ヒト HtrA2 (13B 型) 全長のアミノ酸配列を示し、図 3 中、図 2 のピーク 1 のアミノ酸配列に下線を付した。やじりは成熟型 HtrA2 が生成する際の切断部位を示している。ヒト HtrA2 の 13B 型は 458 アミノ酸のタンパク質であるが、ミトコンドリアへの輸送後、N 末端の 133 アミノ酸が切り落とされる；その結果、HtrA2 の 13B 型は 36 kDa となる。それゆえ、本発明者らが解析したバンドは成熟型 HtrA2 にサイズの点でも同じになる。

#### 〔実施例 2〕 抗ヒト HtrA2 に対する抗体の作製

ヒト HtrA2 およびヒト XIAP に対する抗血清は、C 末ヘキサヒスチジンタグ付き組み換え型 HtrA2 タンパク質と N 末 GST タグ付き組み換え型 XIAP-BIR1 タンパク質を Suzuki et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 27058-63 記載の方法で調製しこのタンパク質抗原をそれぞれウサギに免疫し作製した。

#### 〔実施例 3〕 HtrA2 前駆体および成熟型 HtrA2 の IAP への結合

図 1 のように、内因性の HtrA2 が過剰発現した XIAP $\Delta$ RING と共沈したので、こんどは細胞内で内因性の HtrA2 が内因性の XIAP に結合するかどうかチェックした。HEK293 細胞抽出液 (1mg タンパク質) を、プロテイン G に結合させたコントロール抗体または抗 XIAP 抗体と共に 4℃ で 4 時間インキュベートし、免疫沈降物を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に

転写後、抗 HtrA2 抗体または抗 XIAP 抗体によりイムノブロット解析した。図 4 に示されるように、内因性の HtrA2 は内因性の XIAP と共沈し、XIAP と HtrA2 の結合が生理的にも意義深いことを強く裏付けた。図 4 中、IgG の重鎖および軽鎖をやじりで示した。

次に IAP ファミリータンパク質と HtrA2 の結合を検討するため、さまざまな N 末 FLAG-または Myc-タグの IAP、XIAP、c-IAP1、c-IAP2、サバイビンなどを C 末 HA タグのヒト HtrA2 タンパク質をコードするプラスミドとともに一過性にトランスフェクションした。アミノ末端 FLAG タグ付き IAP およびアミノ末端 Myc タグ付き IAP とカルボキシ末端 HA タグ付き HtrA2 を HEK293 細胞に共発現させ全細胞抽出液および抗 FLAG 抗体または抗 Myc 抗体による免疫沈降物（それぞれ IP: FLAG と IP: Myc）を抗 FLAG 抗体、抗 Myc 抗体あるいは抗 HA 抗体にてイムノブロット解析した。その結果、50kDa の HtrA2 前駆体タンパク質はどの IAP と共沈しなかったが、36kDa の成熟型 HtrA2 タンパク質は XIAP、c-IAP1、c-IAP2 と共沈した。成熟型 HtrA2 は Smac が結合すると報告されているサバイビンには結合しなかった (Du et al., (2000) Cell 102, 33-42) (図 5)。これらの結果は成熟型 HtrA2 が強力なカスパーゼ阻害活性を持つ、XIAP、c-IAP1、c-IAP2 のような IAP タンパク質と結合しやすいことを示している (Deveraux, et al., (1997) Nature 388, 300-4; Roy et al., (1997) EMBO J. 16, 6914-25; Tamm et al., (1998) Cancer Res. 58, 5315-20)。

#### 〔実施例 4〕 HtrA2 による XIAP のカスパーゼ阻害活性の阻害

成熟型 HtrA2 ができるためには 134 番目のアラニンより前の配列が切り落とされる (Savopoulos et al., (2000) Protein Expr. Purif. 19, 227-34) (図 6)。図 6 中、膜貫通領域 (TM)、トリプシンに似た活性部位および PDZ ドメインをそれぞれ相当するアミノ酸の番号と共に示した。S306 は活性中心のセリン残基を S306 と示した。recHtrA2 (AVPS) と recHtrA2 (MVPS) はそれぞれ成熟型 HtrA2 の野生型とアミノ末端変異型組み換えタンパク質を示し、アミノ末端の配列をカッコ ( ) 内に示した。成熟型 HtrA2 の最初の 4 つのアミノ酸配列は AVPS である。この配列は AVPI

という Smac の N 末端の配列に大変良く似ている。Smac は XIAP の BIR2 と BIR3 ドメインに結合するため、N 末端の配列が変異や修飾などを受けず、正常に保たれている必要がある (Chai et al., (2000) Nature 406, 855-62)。そのうえ、カスパーゼ-9 の小サブユニットなどのように Smac と似た N 末端配列を持つ分子は XIAP に結合することが示されている (Srinivasula et al., (2001) Nature 410, 112-6)。これらの結果は成熟型 HtrA2 が Smac と似たやり方で XIAP に結合し、その活性を阻害する可能性を示唆する (Chai et al., (2000) Nature 406, 855-62)。これを検討するため、本発明者らは野生型および最も N 末端のアラニンをメチオニンに変異させた変異型の成熟型 HtrA2 の大腸菌組み換えタンパク質を作製した。これらのタンパク質はそれぞれ recHtrA2 (AVPS) および recHtrA2 (MVPS) と名付けられ、野生型およびさまざまな変異体の XIAP の glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質との結合実験に供された。野生型およびアミノ末端変異型組み換え型 HtrA2 タンパク質を GST タグ付き組み換え型 XIAP タンパク質にてプルダウンした後、抗ペンタヒスチジン抗体および抗 GST 抗体にてイムノプロット解析した。予想通り、recHtrA2 (AVPS) は XIAP の BIR2 および BIR3 ドメインに結合したが、recHtrA2 (MVPS) は全く XIAP に結合しなかった (図 7)。図 7 中、ヘキサヒスチジントグ付き組み換え型 HtrA2 タンパク質をやじりで示した。HtrA2 と XIAP の結合の仕方は Smac と XIAP の結合の仕方に似ていた。そこで Smac と似ている HtrA2 が XIAP のカスパーゼ阻害効果を減弱させるかどうか明らかにするため、本発明者らは recHtrA2 (AVPS) および recHtrA2 (MVPS) がカスパーゼ-3 の活性を上昇させるか、もしくはカスパーゼ-3 の活性化を促進するか検討した。実験系として 293 細胞抽出液にチトクロム c を加えることによって試験管内で (インビトロで) カスパーゼ-3 の活性化が再現される無細胞系を選んだ (Deveraux et al., (1997) Nature 388, 300-4)。BIR3+RING ドメインは活性化型カスパーゼ-9 を直接阻害することによってプロカスパーゼ-3 が大サブユニットと小サブユニットにインビトロで切断/活性化されるのを防ぐ (Deveraux et al., (1999) EMBO J. 18, 5242-51)。それに対し、BIR2 ドメインはカスパーゼ-



3 の直接阻害によってカスパーゼ-3 の大サブユニット p20 から、p19 と p17 が自己分解によってできるのを止める (Deveraux et al., (1997) Nature 388, 300-4) (図 8 と図 9 のレーン 4、7、10 を比較せよ)。図 8 は、カスパーゼ 3 のプロセッシングと XIAP の BIR2 (XIAP-BIR2) および BIR3+RING ドメイン (XIAP-BIR3+RING) の作用点を示す。カスパーゼ 9 によりカスパーゼ 3 (p32) は p20 と p12 とにプロセッシングされる。この過程を XIAP-BIR3+RING が阻害する。また、カスパーゼ 3 自身によりカスパーゼ 3 の p20 は p19 および p17 にプロセッシングされる。この過程を XIAP-BIR2 が阻害する。各精製タンパク質の存在、非存在下で、HEK293 細胞の細胞質画分にチトクロム c と dATP とを加えカスパーゼ 3 を活性化した。カスパーゼ 3 の活性化は抗カスパーゼ 3 抗体を用いたイムノブロット解析により検出した。RecHtrA2 (AVPS) は BIR2 ならびに BIR3+RING によるカスパーゼ-3 のプロセッシングを抑えるが、recHtrA2 (MVPS) にはそのような作用はみられなかった (図 9)。これは、recHtrA2 (AVPS) は XIAP の BIR2 (GST-BIR2) のカスパーゼ 3 活性阻害作用および BIR3 (GST-BIR3) のカスパーゼ 9 活性阻害作用の作用を阻害するが、recHtrA2 (MVPS) は阻害しないことを示す。図 9 中、大腸菌からの微量のコンタミネーションで抗カスパーゼ 3 抗体と交差反応するバンドを白抜きのやじりで示した。これらの結果は HtrA2 が Smac と大変良く似たやり方で XIAP のカスパーゼ阻害活性を阻害することを示している。

〔実施例 5〕 XIAP による HtrA2 のセリンプロテアーゼ活性の阻害の検討

XIAP が HtrA2 のセリンプロテアーゼ活性を阻害するかどうか調べるため、ベータカゼインを基質としてインビトロのプロテアーゼアッセイを行った。 $\beta$ -カゼイン ( $6\mu\text{M}$ ) を GST-XIAP 組み換えタンパク質の存在下または非存在下で 5nM の HtrA2 組み換えタンパク質と共にインキュベートし、1 および 2 時間後のサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色を行った。組み換え成熟型 HtrA2 は  $37^{\circ}\text{C}$ 、2 時間で 50nM のベータカゼインを完全切断する (図 10)。XIAP は  $2\mu\text{M}$  の高濃度においても、HtrA2 によるベータカゼインのインビトロでの切断を阻害しなかった。この結

果は XIAP が成熟型 HtrA2 に結合はするが、阻害活性はもたないことを示している。

#### 〔実施例 6〕 HtrA2 の放出

PSORT 解析によって HtrA2 はミトコンドリアタンパク質であることが予測されたが、過去の報告では HtrA2 は小胞体、または核にあるなどとの報告がなされていた (Faccio et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2581-8; Gray et al., (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5699-710)。加えて、HtrA2 にはミトコンドリアタンパク質である Smac と同様の作用があることがわかったので、HtrA2 の細胞内局在を再検討した。HeLa 細胞での細胞分画で、HtrA2 がミトコンドリアのタンパク質であるチトクロム c と同じく Heavy Membrane Fraction に回収された (図 1 1)。HtrA2 はチトクロム c (Cyt c) と共にミトコンドリアを含む重膜画分 (HM) に検出された。プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) と XIAP はそれぞれ軽膜画分 (LM) と細胞質画分 (CE) の指標として用いた (図 1 1)。組み換え HtrA2 に対して作製した抗血清による HeLa 細胞の免疫染色では、ミトコンドリアにおいて HtrA2 とチトクロム c がよく共局在していることがわかった。しかし UV 刺激によってアポトーシスが誘導されると、HtrA2、チトクロム c とともに点状のミトコンドリアパターンからび漫性に広がる細胞質パターンへと免疫染色上、変化がみられる。2つのタンパク質はともに UV 照射後 4 時間で「び漫性」の染色パターンを示しはじめる (図 1 2)。これらの免疫染色でとらえられた変化を生化学的方法で確認するため、UV 照射を行った細胞と行わなかった細胞から細胞質を抽出した。図 1 3 は、HtrA2 とチトクロム c (Cyt c) の UV 照射後の細胞質画分への移行を示す。HeLa 細胞に UV (100 mJ/cm<sup>2</sup>) 照射し、図に示す時間後の細胞質画分中の各タンパク質を図に示す抗体によりイムノプロット解析した。図 1 3 に示されるように、照射しない細胞では HtrA2 とチトクロム c は細胞質抽出液には検出されなかった。ところが UV 照射後 4 時間で HtrA2 とチトクロム c は同時に細胞質に観察された。これらの結果から、HtrA2 は Smac と似て、アポトーシス刺激に反応して細胞質に放出されるミトコンドリアタンパク質であることが明らかになった。

そればかりでなく、ヒトの神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルである変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄から細胞質を抽出して調べると、加齢、すなわち病気の進行に伴い HtrA2 が細胞質に放出されてくることがわかった (図 1 4)。この所見は野性型 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄や同じ変異 SOD1 マウスでも病変の生じない小脳 (cerebellum) では認められなかった。このことから、HtrA2 がヒトの神経変性疾患に伴う神経細胞死にも関与していることが示唆された。

〔実施例 7〕 HtrA2 による細胞の UV に対する感受性の促進

HtrA2 の細胞における役割を研究するため、C 末端に Myc タグのついた全長の HtrA2 および全長の Smac をコードするプラスミドを HeLa 細胞に一過性にトランスフェクト (遺伝子導入) した。次いで UV 照射によりアポトーシスを誘導した。HeLa 細胞に  $0.8 \mu\text{g}$  の pcDNA3 (Mock)、pcDNA3-Smac-Myc (Smac)、pcDNA3-HtrA2-Myc (HtrA2) を  $0.2 \mu\text{g}$  の pEGFP プラスミドと共に発現させ、24 時間後に UV 照射 ( $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) した。図 1 5 に示す時間後に細胞抽出液を調製し、 $30 \mu\text{g}$  の抽出液中の DEVDase 活性を測定した。図 1 5 に示されるように、UV  $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  照射 4 時間後、HtrA2 と Smac をトランスフェクトした細胞は対照の細胞に比べてカスパーゼ-3 様の DEVDase 活性が有意に上昇していた (Du et al., (2000) Cell 102, 33-42) (図 1 2、図 1 3)。図 1 5 中、エラーバーはトリプリケイトで行った測定の標準誤差を示した。図 1 2 は、HtrA2 とチトクロム c (Cyt c) の免疫染色の結果を示す。免疫染色において、通常の状態と UV ( $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ) 照射 4 時間後の HtrA2 と Cyt c の細胞内局在を抗 HtrA2 抗体および抗 Cyt c を用いて検出した。これらの結果は HtrA2 が Smac 同様アポトーシス誘導作用があること、また Smac と HtrA2 はともに似たメカニズムでこのような効果をもたらしているという考えを支持するものでもある。

〔実施例 8〕 ミトコンドリア外で発現させた HtrA2 による細胞死の誘導

HtrA2 の IAP 非依存的な作用を調べた。大腸菌組み換えタンパク質 *recHtrA2* (AVPS) および *recHtrA2* (MVPS) 作製時に用いた大腸菌発現ベクターと、タグの部分だけ異なる哺乳類発現ベクターを構築した (図 6)。HtrA2 (MVPS) が全く XIAP に結合しないのはよいとして、期待に反し、HtrA2 (AVPS) もほとんど XIAP に結合しなかった。これは HtrA2 (AVPS) の N 末端のアセチル化などの翻訳後修飾によることを示唆する。そこで、その後の解析においても HtrA2 (AVPS) を用いた。このコンストラクトからできる成熟型 HtrA2 は細胞質に局在していた (データ供覧せず)。

HEK293 細胞に  $1\mu\text{g}$  の pcDNA3 (Mock) あるいは pcDNA3-mature HtrA2-Myc (mature HtrA2) プラスミドを  $0.2\mu\text{g}$  の pEGFP プラスミドと共に発現させ、30 時間後に GFP 陽性細胞を共焦点レーザー顕微鏡により可視化した (図 15)。驚いたことに、HtrA2 (AVPS) の過剰発現は細胞の円形化と収縮を伴うアポトーシス様の形態変化を示した。成熟型 HtrA2 は非典型的な細胞死を誘導することが示された。また、HEK293 細胞に  $1\mu\text{g}$  の pcDNA3 (Mock)、pcDNA3-mature HtrA2-Myc (mature HtrA2)、pcDNA3-mature HtrA2 (S/A)-Myc [mature HtrA2 (S/A)、活性中心のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体]、pcDNA3-HtrA2-Myc (FL-HtrA2) あるいは pcDNA3-Smac-Myc (FL-Smac) プラスミドを  $0.2\mu\text{g}$  の pEGFP プラスミドと共に発現させ、24 時間後に丸くなったり、凝縮していた GFP 陽性細胞を数えた (図 17)。成熟型 HtrA2 のプロテアーゼ活性が非典型的な細胞死誘導に必要であることが示された。図 17 中、エラーバーはトリプリケイトで行った測定 of 標準誤差を示した。ところがこの顕著な細胞形態の変化はメンブレンプレピング、アポトーシス小体形成を伴わず、DAPI で見る限り、めだった核形態変化も観察されなかった (データ供覧せず)。しかもトリパンブルー色素排出試験で見る限りでは、HtrA2 発現細胞のほとんどは”死んでいなかった”。トランスフェクションから 60 時間を経ても、モックでも HtrA2 発現細胞でもトリパンブルー陽性細胞はトランスフェクションされた細胞全体の 5%以下であった。HtrA2 過剰発現細胞はこのように色素を排出したが、一旦変化を起こすと、増殖あるいは回復せず、最終的にはトランスフェクション後 100 時間までにプレートか

ら離れ、浮いてくるのが観察された。この非典型的な“細胞形態変化”を非典型的な”細胞死“であることが示唆された。HEK293細胞に図18に示したプラスミドを図17に結果を示す検討と同様に pEGFP プラスミドと共に発現させ、24時間後に細胞抽出液を調製し、100  $\mu$ g の抽出液中の DEVDase 活性を測定した。図18中、エラーバーはトリプリケイトで行った測定の標準誤差を示した。HEK293細胞に図19に示したプラスミドを図17に結果を示す検討と同様に pEGFP プラスミドと共に発現させた。トランスフェクション中および、その後のインキュベーション中に図19に示すように、100  $\mu$ M の広範なカスパーゼインヒビターである z-VAD-fmk を加えていた。図19中、エラーバーはトリプリケイトで行った測定の標準誤差を示した。陽性コントロールの Bax 過剰発現細胞抽出液では陰性コントロールの細胞抽出液の3倍以上のカスパーゼ活性が検出されたにもかかわらず、HtrA2 過剰発現細胞の抽出液中にはバックグラウンドレベルのカスパーゼ活性しか検出できなかった。さらに HtrA2 により誘起される細胞死は zVAD-fmk、XIAP で抑制できなかった。この場合の陽性コントロール Fas の場合は両障害因子で著明に細胞死が抑えられた(図19)。注目すべきことに、セリンプロテアーゼの活性中心をセリンからアラニンに変異させた不活性型の変異体はほとんど細胞死誘導効果を失っていた(図17)。これらのデータにより、カスパーゼインヒビターは HtrA2 の作用を阻害せず、ミトコンドリアの外部に過剰発現させた成熟型 HtrA2 はカスパーゼ非依存型、セリンプロテアーゼ活性依存型の細胞死を引き起こすことが明らかになった。

HtrA2 を Smac から区別するユニークな特徴は成熟型 HtrA2 を細胞質で過剰発現させると非典型的な細胞死を引き起こす点である。HtrA2 を細胞質で過剰発現する細胞は顕著な細胞の円形化と縮小をしめすが、メンブレプレビングやアポトーシス小体の形成はみられず、細胞膜も破たんしていない。この HtrA2 誘発性の細胞死はカスパーゼ阻害剤で阻止されないが、HtrA2 のセリンプロテアーゼ活性をなくした変異体では細胞死誘導効果は失われてしまう(図17、18)。

本実施例においては、細胞質内で修飾されない N 末端を持った成熟型

HtrA2 を発現させていないので、HtrA2 による細胞死が XIAP との結合で抑制されるかどうかは明らかでない。しかし、組み換え XIAP タンパクが成熟型 HtrA2 のセリンプロテアーゼ活性を抑制できなかったことは、XIAP は HtrA2 への結合能の強弱に関わりなく、HtrA2 による細胞死を抑えることを示唆している。

本明細書中に示した参考文献は以下のとおりである。

〔参考文献〕

ADDIN ENBbu Abrams, J. M. (1999). An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends. Cell Biol.* 9, 435-40.

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-62.

Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 18, 5242-51.

Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-52.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-23.

Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C.

(1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-4.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., and Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15, 2685-94.

Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J. V., and Zervos, A. S. (2000). Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.* 275, 2581-8.

Ferrari, D. M., and Soling, H. D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339, 1-10.

Gray, C. W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N. J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., A megadzie, B., Davis, J. B., Dingwall, C., Livi, G. P., and Creasy, C. L. (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.* 267, 5699-710.

Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.

Holcik, M., and Korneluk, R. G. (2001). OPINION XIAP, the guardian angel. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 550-6.

Hu, S. I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., and Crowl, R. M. (1998). Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.* 273, 34406-12.

Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-54.

Kawasaki, H., Emori, Y., and Suzuki, K. (1990). Production and separation of peptides from proteins stained with Coomassie brilliant blue R-250 after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 191, 332-6.

Kitanaka, C., and Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 6, 508-15.

Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513-9.

Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription.



Nucleic Acids Res. 16, 10053-67.

Lipinska, B., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1990). The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172, 1791-7.

Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K., and Soejima, M. (1981). Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M4 97-1. I. Purification and some enzymatic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 660, 44-50.

Miller, L. K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends. Cell Biol.* 9, 323-8.

Roberts, D. L., Merrison, W., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2001). The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J. Cell Biol.* 153, 221-8.

Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-25.

Savopoulos, J. W., Carter, P. S., Turconi, S., Pettman, G. R., Karran, E. H., Gray, C. W., Ward, R. V., Jenkins, O., and Creasy, C. L. (2000). Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein Expr. Purif.* 19, 227-34.

Seol, J. H., Woo, S. K., Jung, E. M., Yoo, S. J., Lee, C. S., Ki

m, K. J., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D. B., and Chung, C. H. (1991). Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the htrA gene product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 730-6.

Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14376-81.

Spiess, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-47.

Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-6.

Sun, C., Cai, M., Meadows, R. P., Xu, N., Gunasekera, A. H., Herrmann, J., Wu, J. C., and Fesik, S. W. (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275, 33777-81.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., and Takahashi, R. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J. Biol. Chem.* 276, 27058-63.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8662-7.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 273, 7787-90.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58, 5315-20.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

#### 産業上の利用可能性

実施例が示すように、本発明の HtrA2 タンパク質は、従来知られてい

ないタイプの細胞死に関与する細胞死誘導因子であり、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングおよび細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングに有用である。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

## 請求の範囲

1. 細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 タンパク質。
2. 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される、請求項 1 記載のヒト HtrA2 タンパク質。
3. ヒト HtrA2 タンパク質が配列番号 2 に示される配列の第 134 番目から第 458 番目のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 記載のヒト HtrA2 タンパク質。
4. 細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。
5. 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される、請求項 4 記載のヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。
6. ヒト HtrA2 タンパク質が配列番号 2 に示される配列の第 134 番目から第 458 番目のアミノ酸配列を含む、請求項 4 または 5 記載のヒト HtrA2 を発現する細胞。
7. 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載のヒト HtrA2 タンパク質を用いた、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニング方法。
8. 請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項記載のヒト HtrA2 タンパク質を発現する細胞を用いた、細胞死の過剰によって起こる疾患の治療に用いる抗細胞死因子のスクリーニング方法。
9. 細胞死の過剰によって起こる疾患が、神経変性疾患、脳虚血、心筋梗塞およびエイズよりなる群から選択される、請求項 7 または 8 記載の抗細胞死因子のスクリーニング方法。
10. ヒト HtrA2 タンパク質のセリンプロテアーゼ活性を阻害する因子のスクリーニングである、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項記載のスクリーニング方法。

1 1. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。

1 2. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、請求項 1 1 記載のヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え細胞。

1 3. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニングのための、ヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え動物。

1 4. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、請求項 1 3 記載のヒト HtrA2 遺伝子またはその変異体を含みヒト HtrA2 タンパク質を発現する組換え動物。

1 5. 請求項 1 1 または 1 2 記載の細胞に被験物質を投与し、ミトコンドリアから細胞質への HtrA2 タンパク質の放出を測定することを含む、細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1 6. 請求項 1 3 または 1 4 記載の動物に被験物質を投与し、ミトコンドリアから細胞質への HtrA2 タンパク質の放出を測定することを含む、細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1 7. 細胞死の異常な抑制によって起こる疾患が自己免疫疾患または癌である、請求項 1 5 または 1 6 記載の細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

1 8. ミトコンドリアから細胞質へ放出される HtrA2 タンパク質を抗 HtrA2 タンパク質抗体を用いて測定する、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載の細胞死の異常な抑制によって起こる疾患の治療薬のスクリーニング方法。

図1

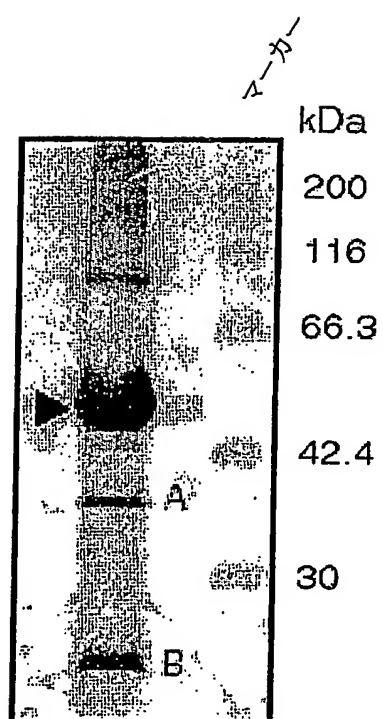
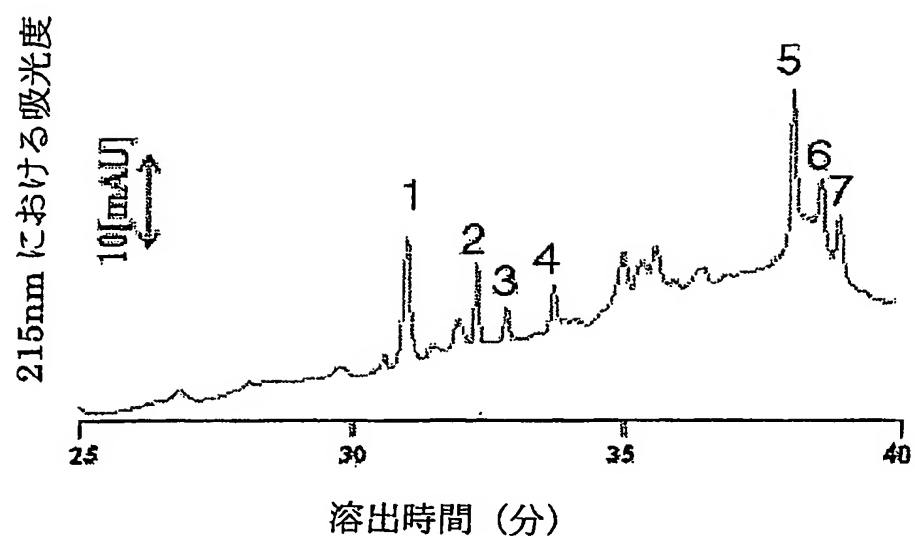


図2





## 図3

MAAPRAGRGAGWSLRAWRALGGIRWGRRPRLTPDLRALLT	40
SGTSDPRARVTYGTPSLWARLSVGVTEPRACLTSGTPGPR	80
AQLTAVTPDTRTREASENSGTRSRAWLAVALGAGGAVLLL	120
LWGGGRGPPAVLA <u>AVPSPPPASPRSQYNFIADVVEKTAPA</u>	160
▲ VVYIEILDRHPFLGREVPISNGSGFVVAADGLIVTNAHV	200
ADRRRVRRVRLLSGDTYEAVVTAVDPVADIATLRIQTKEPL	240
PTLPLGRSADVVRQGEFVVAMGSPFALQNTITSGIVSSAQR	280
PARDLGLPQTNVEYIQTDAIDFGNSGGPLVNL DGEVIGV	320
NTMKVTAGISFAIPSDRLREFLHRGEKKNSSSGISGSQRR	360
YIGVMMLTLSPSILAELQLREPSFPDVQHGVLIHKVILGS	400
PAHRAGLRPGDVILAIGE QMVQNAEDVYEAVRTQSQLAVQ	440
IRRGRETLTLYVTPEVTE	458

図4

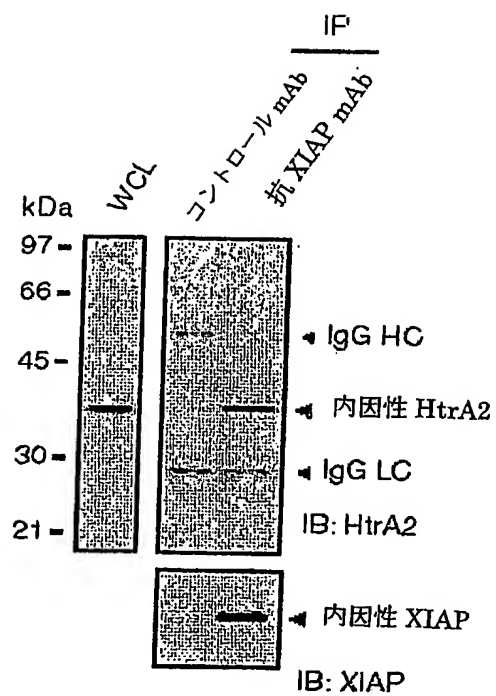


図5

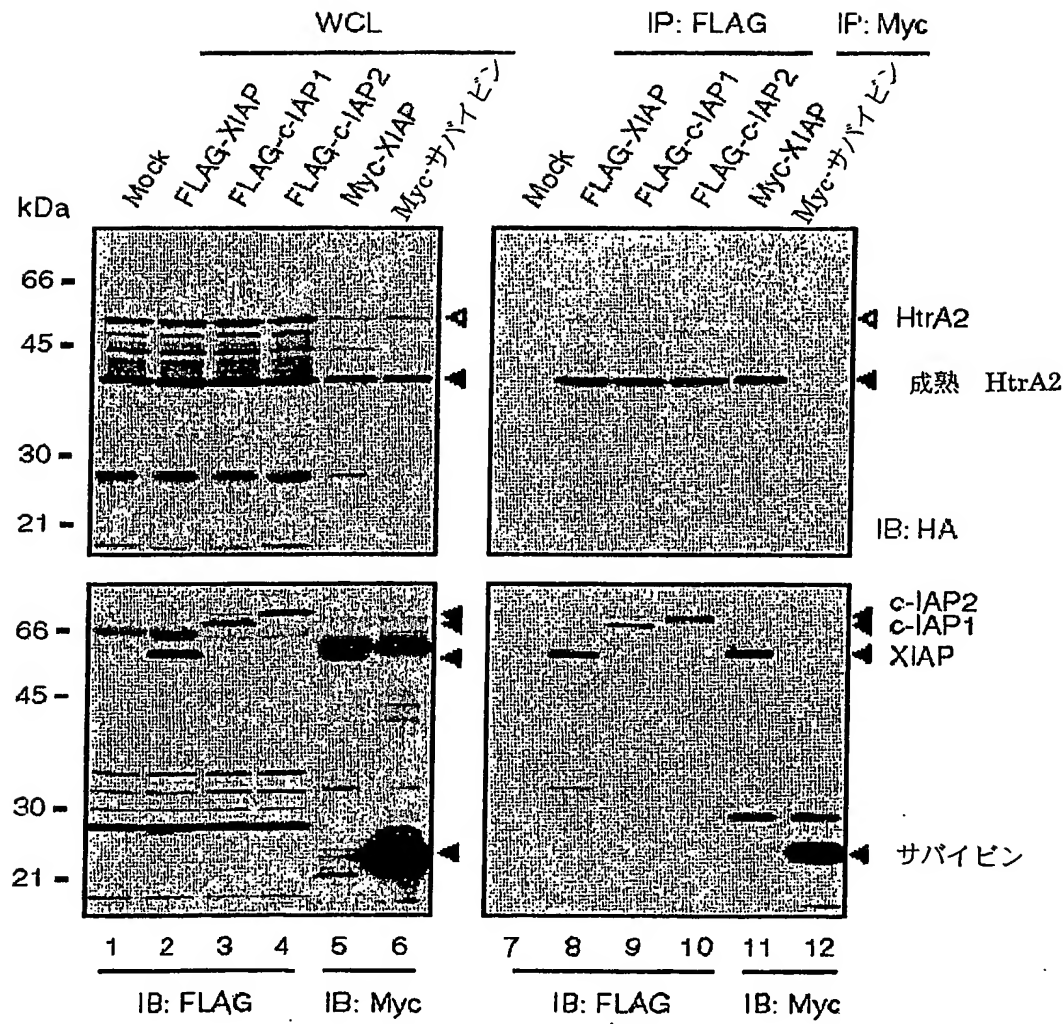


図6

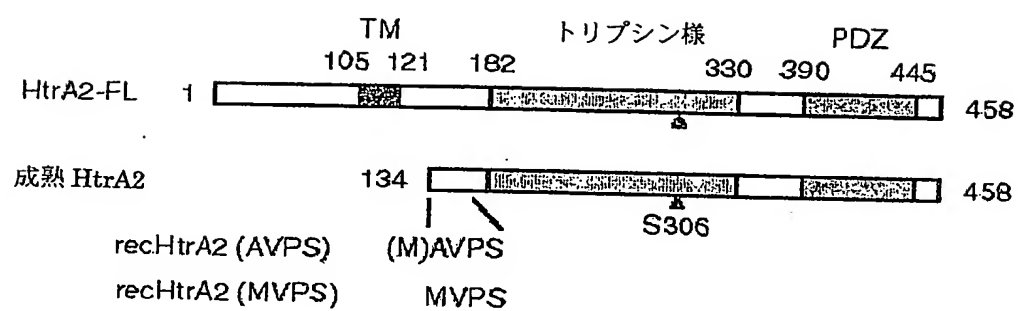


図7

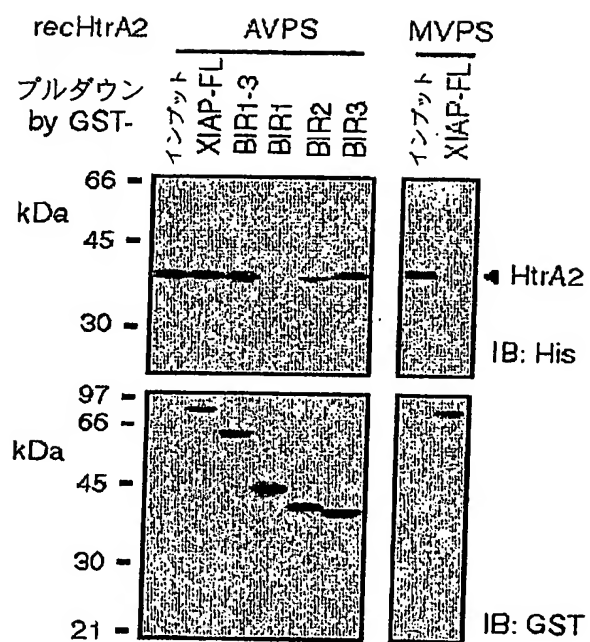


図8

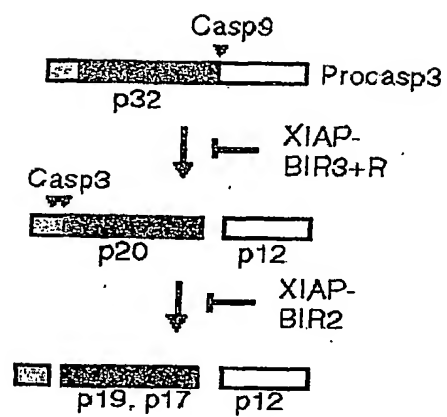


図9



図10

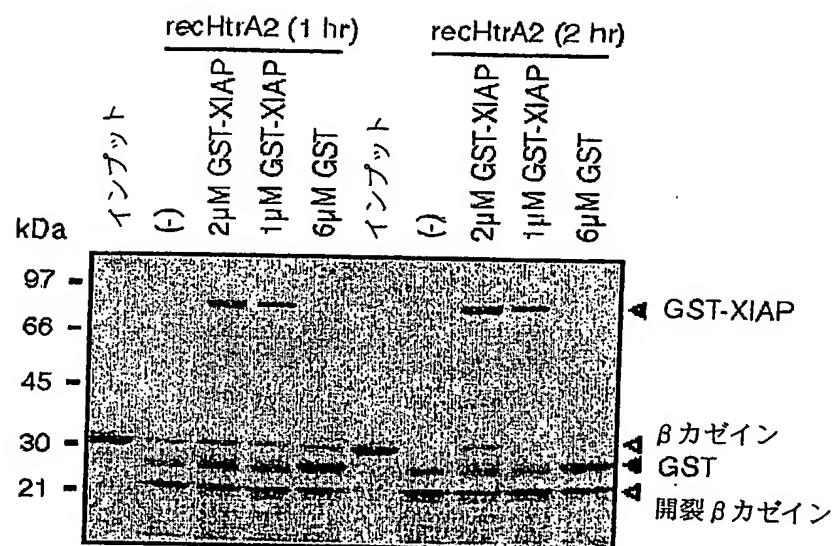




図 11

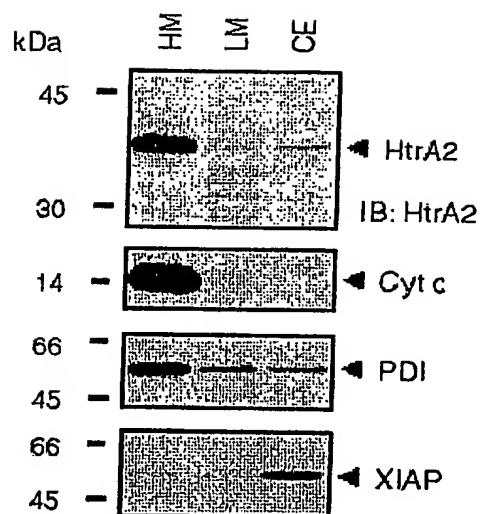


図12

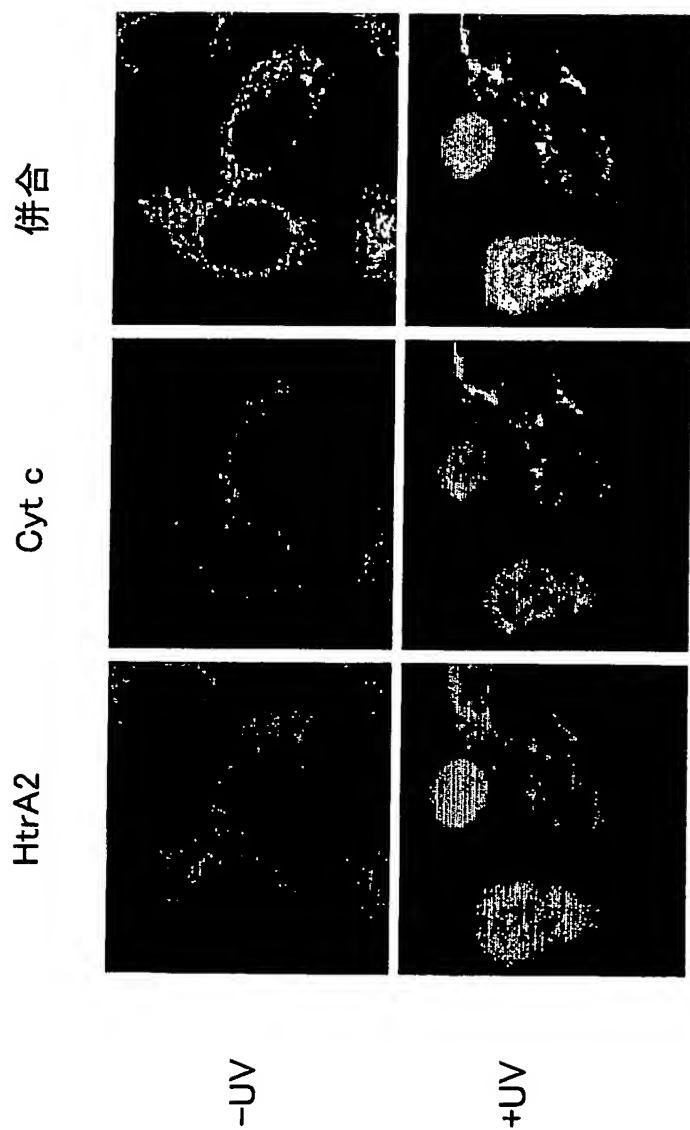


図13

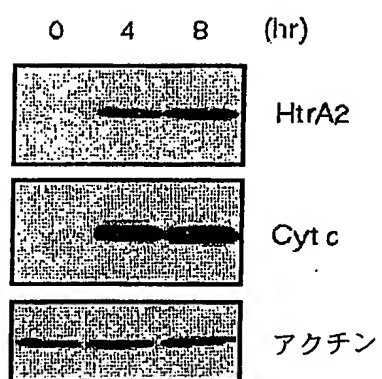


図14

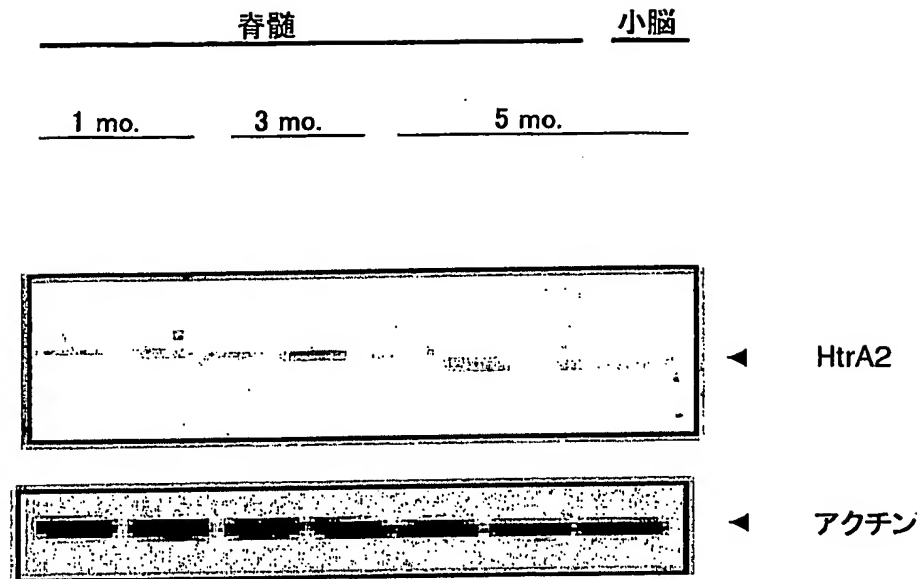


図15

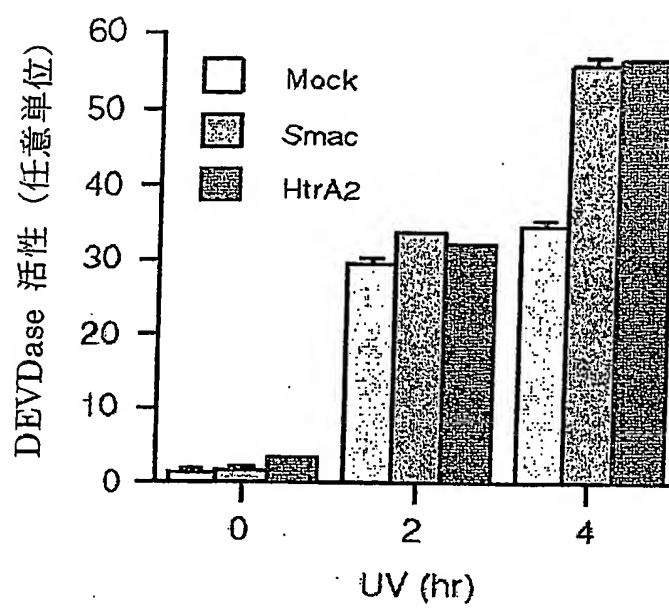


図16

成熟 HtrA2

Mock

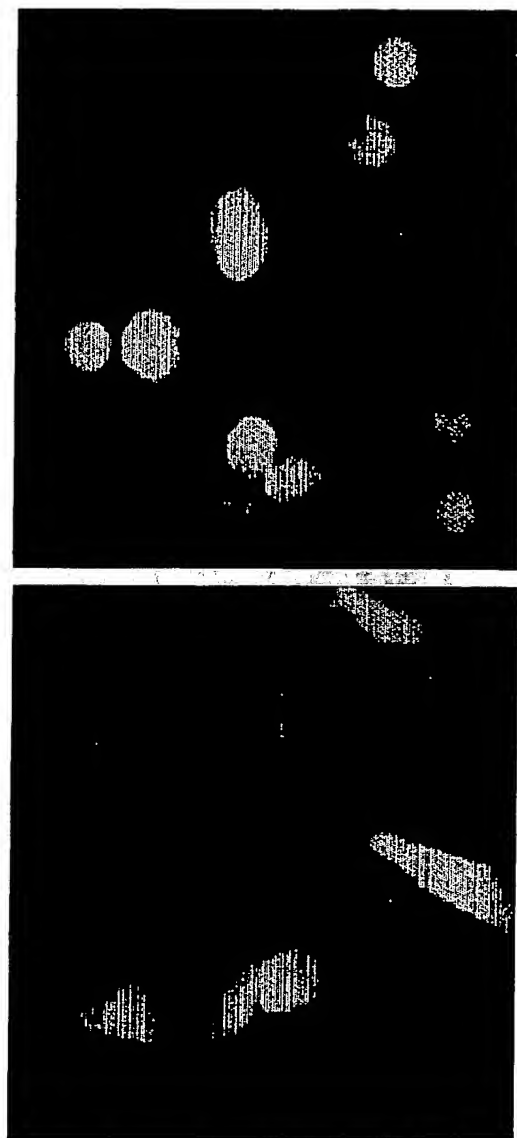


図17

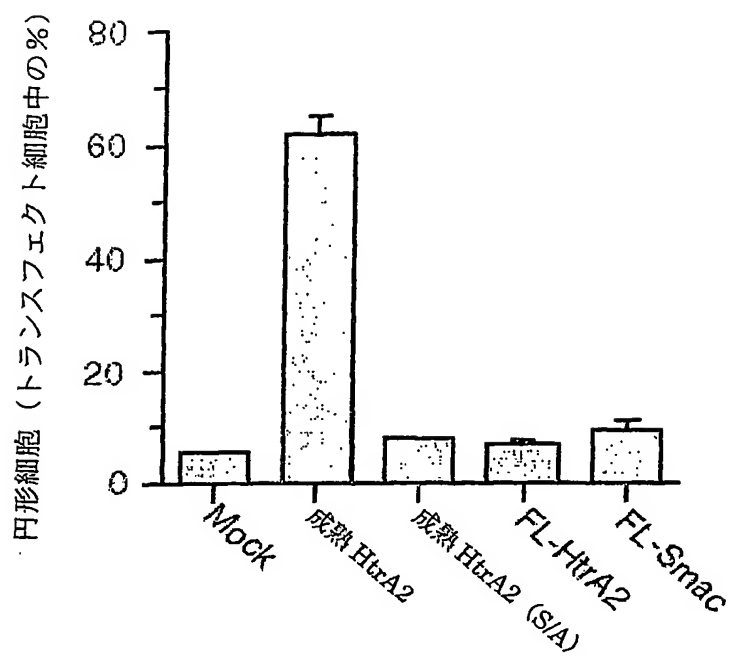


図18.

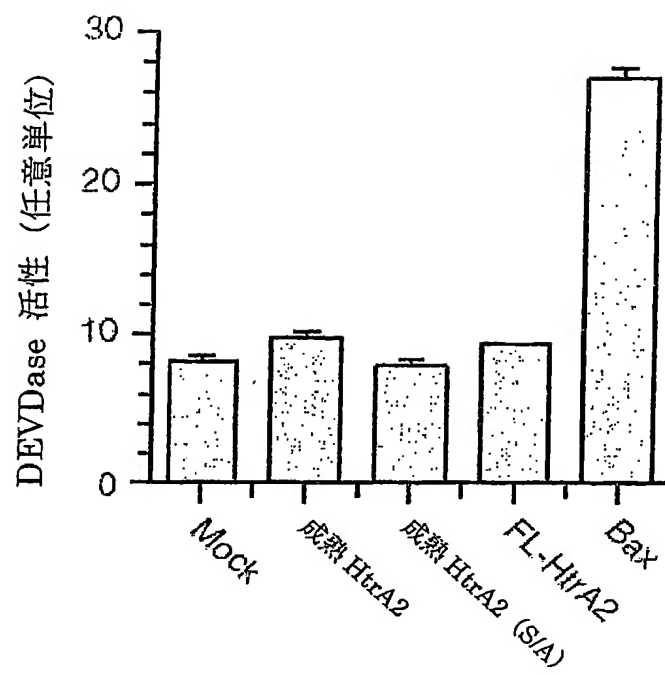
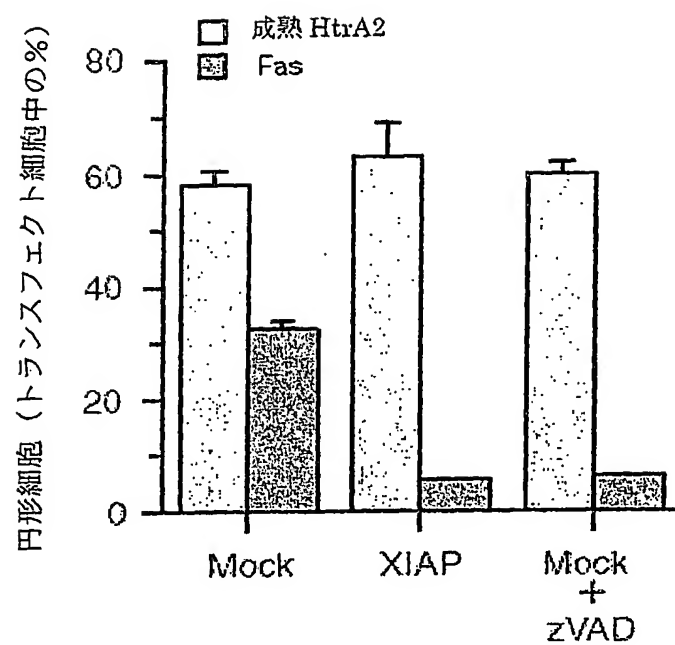




図19



## SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A cell death inducing factor, a cell and an animal expressing the same, and a method for screening an anti cell death treating medicament

<130> RFH14-022N

<140>

<141>

<150> JP 2001/294794

<151> 2001-09-26

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (29).. (1405)

<400> 1

gggcgaggag gcagccaagg cggagctg atg gct gcg ccg agg gcg ggg cgg 52

Met Ala Ala Pro Arg Ala Gly Arg

1

5

ggt gca ggc tgg agc ctt cgg gca tgg cgg gct ttg ggg ggc att cgc 100

Gly Ala Gly Trp Ser Leu Arg Ala Trp Arg Ala Leu Gly Gly Ile Arg

10

15

20

tgg ggg agg aga ccc cgt ttg acc cct gac ctc cgg gcc ctg ctg acg 148

Trp Gly Arg Arg Pro Arg Leu Thr Pro Asp Leu Arg Ala Leu Leu Thr

25

30

35

40

tca gga act tct gac ccc cgg gcc cga gtg act tat ggg acc ccc agt 196

Ser Gly Thr Ser Asp Pro Arg Ala Arg Val Thr Tyr Gly Thr Pro Ser

45

50

55

ctc tgg gcc cgg ttg tct gtt ggg gtc act gaa ccc cga gca tgc ctg 244

Leu Trp Ala Arg Leu Ser Val Gly Val Thr Glu Pro Arg Ala Cys Leu

60

65

70

acg tct ggg acc ccg ggt ccc cgg gca caa ctg act gcg gtg acc cca 292

Thr Ser Gly Thr Pro Gly Pro Arg Ala Gln Leu Thr Ala Val Thr Pro

75

80

85

gat acc agg acc cgg gag gcc tca gag aac tct gga acc cgt tcg cgc 340

Asp Thr Arg Thr Arg Glu Ala Ser Glu Asn Ser Gly Thr Arg Ser Arg

90

95

100

gcg tgg ctg gcg gtg gcg ctg ggc gct ggg ggg gca gtg ctg ttg ttg 388

Ala Trp Leu Ala Val Ala Leu Gly Ala Gly Gly Ala Val Leu Leu Leu

105

110

115

120

ttg tgg ggc ggg ggt cgg ggt cct ccg gcc gtc ctc gcc gcc gtc cct 436  
 Leu Trp Gly Gly Gly Arg Gly Pro Pro Ala Val Leu Ala Ala Val Pro

125

130

135

agc ccg ccg ccc gct tct ccc cgg agt cag tac aac ttc atc gca gat 484  
 Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp

140

145

150

gtg gtg gag aag aca gca cct gcc gtg gtc tat atc gag atc ctg gac 532  
 Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp

155

160

165

cgg cac cct ttc ttg ggc cgc gag gtc cct atc tcg aac ggc tca gga 580  
 Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly

170

175

180

ttc gtg gtg gct gcc gat ggg ctc att gtc acc aac gcc cat gtg gtg 628  
 Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val

185

190

195

200

gct gat cgg cgc aga gtc cgt gtg aga ctg cta agc ggc gac acg tat 676  
 Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr

205

210

215

gag gcc gtg gtc aca gct gtg gat ccc gtg gca gac atc gca acg ctg 724  
 Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu

220

225

230

agg att cag act aag gag cct ctc ccc acg ctg cct ctg gga cgc tca 772

Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser

235

240

245

gct gat gtc cgg caa ggg gag ttt gtt gtt gcc atg gga agt ccc ttt 820

Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe

250

255

260

gca ctg cag aac acg atc aca tcc ggc att gtt agc tct gct cag cgt 868

Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg

265

270

275

280

cca gcc aga gac ctg gga ctc ccc caa acc aat gtg gaa tac att caa 916

Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln

285

290

295

act gat gca gct att gat ttt gga aac tct gga ggt ccc ctg gtt aac 964

Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn

300

305

310

ctg gat ggg gag gtg att gga gtg aac acc atg aag gtc aca gct gga 1012

Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly

315

320

325

atc tcc ttt gcc atc cct tct gat cgt ctt cga gag ttt ctg cat cgt 1060

Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg

330

335

340

ggg gaa aag aag aat tcc tcc tcc gga atc agt ggg tcc cag cgg cgc 1108

Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg

345

350

355

360

tac att ggg gtg atg atg ctg acc ctg agt ccc agc atc ctt gct gaa 1156  
 Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu  
 365 370 375

cta cag ctt cga gaa cca agc ttt ccc gat gtt cag cat ggt gta ctc 1204  
 Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu  
 380 385 390

atc cat aaa gtc atc ctg ggc tcc cct gca cac cgg gct ggt ctg cgg 1252  
 Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg  
 395 400 405

cct ggt gat gtg att ttg gcc att ggg gag cag atg gta caa aat gct 1300  
 Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala  
 410 415 420

gaa gat gtt tat gaa gct gtt cga acc caa tcc cag ttg gca gtg cag 1348  
 Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln  
 425 430 435 440

atc cgg cgg gga cga gaa aca ctg acc tta tat gtg acc cct gag gtc 1396  
 Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val  
 445 450 455

aca gaa tga atagatcacc aagagtatga ggctcctgct ctgatttcct 1445  
 Thr Glu

ccttgcccttt ctggctgagg ttctgagggc accgagacag agggittaaat gaaccagtgg 1505

gggcagggtcc ctccaaccac cagcactgac tctgggctc tgaagaatca cagaaacact 1565  
 ttttatataa aataaaatta tacctagcaa catattatag taaaaaatga ggtgggaggg 1625  
 ctggatcttt tccccacca aaaggctaga ggtaaagctg tatcccccta aacttagggg 1685  
 agatactgga gctgaccatc ctgacctcct attaaagaaa atgagctgct gccatctttt 1745  
 gtgggcagtt agtcagggtgc tgc 1768

<210> 2

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Ala	Pro	Arg	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Gly	Trp	Ser	Leu	Arg	Ala
1					5					10					15
Trp	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Ile	Arg	Trp	Gly	Arg	Arg	Pro	Arg	Leu	Thr
				20					25					30	
Pro	Asp	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Pro	Arg	Ala
				35				40						45	
Arg	Val	Thr	Tyr	Gly	Thr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ala	Arg	Leu	Ser	Val	Gly
				50				55				60			
Val	Thr	Glu	Pro	Arg	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Pro	Arg
				65				70				75			80
Ala	Gln	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Thr	Arg	Thr	Arg	Glu	Ala	Ser
					85					90					95
Glu	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Ser	Arg	Ala	Trp	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Gly

100	105	110
Ala Gly Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Trp Gly Gly Gly Arg Gly Pro		
115	120	125
Pro Ala Val Leu Ala Ala Val Pro Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Arg		
130	135	140
Ser Gln Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Thr Ala Pro Ala		
145	150	155
Val Val Tyr Ile Glu Ile Leu Asp Arg His Pro Phe Leu Gly Arg Glu		
165	170	175
Val Pro Ile Ser Asn Gly Ser Gly Phe Val Val Ala Ala Asp Gly Leu		
180	185	190
Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Ala Asp Arg Arg Arg Val Arg Val		
195	200	205
Arg Leu Leu Ser Gly Asp Thr Tyr Glu Ala Val Val Thr Ala Val Asp		
210	215	220
Pro Val Ala Asp Ile Ala Thr Leu Arg Ile Gln Thr Lys Glu Pro Leu		
225	230	235
Pro Thr Leu Pro Leu Gly Arg Ser Ala Asp Val Arg Gln Gly Glu Phe		
245	250	255
Val Val Ala Met Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln Asn Thr Ile Thr Ser		
260	265	270
Gly Ile Val Ser Ser Ala Gln Arg Pro Ala Arg Asp Leu Gly Leu Pro		
275	280	285
Gln Thr Asn Val Glu Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asp Phe Gly		
290	295	300
Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Val		
305	310	315
Asn Thr Met Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp		
325	330	335
Arg Leu Arg Glu Phe Leu His Arg Gly Glu Lys Lys Asn Ser Ser Ser		



340 345 350  
 Gly Ile Ser Gly Ser Gln Arg Arg Tyr Ile Gly Val Met Met Leu Thr  
 355 360 365  
 Leu Ser Pro Ser Ile Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Glu Pro Ser Phe  
 370 375 380  
 Pro Asp Val Gln His Gly Val Leu Ile His Lys Val Ile Leu Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Pro Ala His Arg Ala Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Leu Ala Ile  
 405 410 415  
 Gly Glu Gln Met Val Gln Asn Ala Glu Asp Val Tyr Glu Ala Val Arg  
 420 425 430  
 Thr Gln Ser Gln Leu Ala Val Gln Ile Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu  
 435 440 445  
 Thr Leu Tyr Val Thr Pro Glu Val Thr Glu  
 450 455

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 3

ccgcaattgg ccatggctgc gccgagggcg

30

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 4

ctctcgagtt ctgtgacctc aggggtc

27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09959

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/577,  
C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/577,  
C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	EP 828003 A2 (SmithKline Beecham PLC), 11 March, 1998 (11.03.98), & JP 10-117789 A & US 6004794 A	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	WO 98/50406 A1 (Gen Hospital Corp.), 12 November, 1998 (12.11.98), & AU 9874761 A	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	WO 99/36550 A2 (Incyte Phram Inc.), 22 July, 1999 (22.07.99), & AU 9921135 A & EP 1045913 A2 & US 6203979 B1 & JP 2002-508970 A	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 October, 2002 (25.10.02)

Date of mailing of the international search report  
05 November, 2002 (05.11.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09959

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	FACCIO, L. et al., Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. J.Biol.Chem. 2000, Vol.275, No.4, pages 2581 to 2588	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	GRAY, C.W. et al., Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. Eur.J.Biochem. 2000, Vol.267, No.18, pages 5699 to 5710	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	SAVOPOULOS, J.W. et al., Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. Protein Expr.Purif. 2000, Vol.19, No.2, pages 227 to 234	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
P,X	SUZUKI, Y. et al., A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol.Cell. 28 September, 2001 (28.09.01), Vol.8, No.3, pages 613 to 621	1-18
P,X	MARTINS, L.M. et al., The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. J.Biol.Chem. 2002.Jan., Vol.277, No.1, pages 439 to 444	1-18
P,X	VERHAGEN, A.M. et al., HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. J.Biol.Chem. 2002.Jan., Vol.277, No.1, pages 445 to 454	1-18
P,X	HEGDE, R. et al., Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. J.Biol.Chem. 2002.Jan., Vol.277, No.1, pages 432 to 438	1-18
P,X	VAN LOO, G. et al., The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. Cell.Death.Differ. 2002.Jan., Vol.9, No.1, pages 20 to 26	1-18
A	HU, S.I. et al., Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. J.Biol.Chem. 1998, Vol.273, No.51, pages 34406 to 34412	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/53, G01N 33/577, C12Q 1/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/53, G01N 33/577, C12Q 1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	EP 828003 A2 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 1998. 03. 11 & JP 10-117789 A & US 6004794 A	1-6, 11-14 7-10, 15-18
X A	WO 98/50406 A1 (GEN HOSPITAL CORP) 1998. 11. 12 & AU 9874761 A	1-6, 11-14 7-10, 15-18
X A	WO 99/36550 A2 (INCYTE PHARM INC) 1999. 07. 22 & AU 9921135 A & EP 1045913 A2 & US 6203979 B1 & JP 2002-508970 A	1-6, 11-14 7-10, 15-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	25. 10. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	FACCIO, L. et al. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 4, p. 2581-2588	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	GRAY, C. W. et al. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. Eur. J. Biochem. 2000, Vol. 267, No. 18, p. 5699-5710	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
<u>X</u> A	SAVOPOULOS, J. W. et al. Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2. Protein Expr. Purif. 2000, Vol. 19, No. 2, p. 227-234	<u>1-6, 11-14</u> 7-10, 15-18
P, X	SUZUKI, Y. et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol. Cell. 2001. Sep. 28, Vol. 8, No. 3, p. 613-621	1-18
P, X	MARTINS, L. M. et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. J. Biol. Chem. 2002. Jan. , Vol. 277, No. 1, p. 439-444	1-18
P, X	VERHAGEN, A. M. et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. J. Biol. Chem. 2002. Jan. , Vol. 277, No. 1, p. 445-454	1-18
P, X	HEGDE, R. et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. J. Biol. Chem. 2002. Jan. , Vol. 277, No. 1, p. 432-438	1-18
P, X	VAN LOO, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. Cell Death Differ. 2002. Jan. , Vol. 9, No. 1, p. 20-26	1-18
A	HU, S. I. et al. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. J. Biol. Chem. 1998, Vol. 273, No. 51, p. 34406-34412	1-18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**